



(pm)

PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re the Application of

Karine MARION

Group Art Unit: 1651

Application No.: 10/695,823

Examiner: D. WARE

Filed: October 30, 2003

Docket No.: 114120

For: METHOD OF REMOVING A BIOFILM

CLAIM FOR PRIORITY

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign application filed in the following foreign country is hereby requested for the above-identified patent application and the priority provided in 35 U.S.C. §119 is hereby claimed:

French Application No. 02.13963 filed October 31, 2002 in France.

In support of this claim, a certified copy of said original foreign application:

is filed herewith.

It is requested that the file of this application be marked to indicate that the requirements of 35 U.S.C. §119 have been fulfilled and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of this document.

Respectfully submitted,

*Leana Levin*

William P. Berridge  
Registration No. 30,024

Leana Levin  
Registration No. 51,939

WPB:LL/can

Date: February 28, 2007

OLIFF & BERRIDGE, PLC  
P.O. Box 19928  
Alexandria, Virginia 22320  
Telephone: (703) 836-6400

DEPOSIT ACCOUNT USE  
AUTHORIZATION  
Please grant any extension  
necessary for entry;  
Charge any fee due to our  
Deposit Account No. 15-0461

THIS PAGE BLANK (USPS)



en 12963  
D

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

### COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

12 FEV. 2007

Fait à Paris, le \_\_\_\_\_

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIETE  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
[www.inpi.fr](http://www.inpi.fr)

THIS PAGE BLANK (USP16)



INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

cerfa  
N° 11354\*03



### REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 • R / 210502

REMISSION DES PIÈCES		Réervé à l'INPI																																	
DATE	31 OCT. 2002																																		
LIEU	99 0213963																																		
N° D'ENREGISTREMENT																																			
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI																																			
DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI	31 OCT. 2002																																		
Vos références pour ce dossier (facultatif) IT/F25B3187FR																																			
Confirmation d'un dépôt par télécopie																																			
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b> <p><input checked="" type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie 1870</p> <p><b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b></p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Demande de brevet</p> <p><input type="checkbox"/> Demande de certificat d'utilité</p> <p><input type="checkbox"/> Demande divisionnaire</p> <p><i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i></p> <p><input type="checkbox"/> Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i></p> <p><input type="checkbox"/> N° Date _____</p> <p><input type="checkbox"/> N° Date _____</p> <p><input type="checkbox"/> N° Date _____</p>																																			
<b>3 TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum) <b>PROCEDE D'ELIMINATION DU BIOFILM</b>																																			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ</b> <b>OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE</b> <b>LA DATE DE DÉPÔT D'UNE</b> <b>DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b> <p><input type="checkbox"/> Pays ou organisation Date _____ N°</p> <p><input type="checkbox"/> Pays ou organisation Date _____ N°</p> <p><input type="checkbox"/> Pays ou organisation Date _____ N°</p> <p><input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »</p>																																			
<b>5 DEMANDEUR</b> (Cochez l'une des 2 cases) <p><input type="checkbox"/> Personne morale <input checked="" type="checkbox"/> Personne physique</p> <table> <tr> <td>Nom ou dénomination sociale</td> <td colspan="2">MARION</td> </tr> <tr> <td>Prénoms</td> <td colspan="2">Karine</td> </tr> <tr> <td>Forme juridique</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>N° SIREN</td> <td colspan="2">_____</td> </tr> <tr> <td>Code APE-NAF</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>Domicile ou siège</td> <td colspan="2">Rue Chemin de Rollinière</td> </tr> <tr> <td></td> <td colspan="2">Code postal et ville 13182190 SATOLAS</td> </tr> <tr> <td></td> <td colspan="2">Pays FRANCE</td> </tr> <tr> <td>Nationalité</td> <td colspan="2">FRANCAISE</td> </tr> <tr> <td>N° de téléphone (facultatif)</td> <td colspan="2">N° de télécopie (facultatif)</td> </tr> <tr> <td>Adresse électronique (facultatif)</td> <td colspan="2"></td> </tr> </table> <p><input checked="" type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »</p>			Nom ou dénomination sociale	MARION		Prénoms	Karine		Forme juridique			N° SIREN	_____		Code APE-NAF			Domicile ou siège	Rue Chemin de Rollinière			Code postal et ville 13182190 SATOLAS			Pays FRANCE		Nationalité	FRANCAISE		N° de téléphone (facultatif)	N° de télécopie (facultatif)		Adresse électronique (facultatif)		
Nom ou dénomination sociale	MARION																																		
Prénoms	Karine																																		
Forme juridique																																			
N° SIREN	_____																																		
Code APE-NAF																																			
Domicile ou siège	Rue Chemin de Rollinière																																		
	Code postal et ville 13182190 SATOLAS																																		
	Pays FRANCE																																		
Nationalité	FRANCAISE																																		
N° de téléphone (facultatif)	N° de télécopie (facultatif)																																		
Adresse électronique (facultatif)																																			

Remplir impérativement la 2<sup>me</sup> page

BREVET D'INVENTION  
 CERTIFICAT D'UTILITÉ

 REQUÊTE EN DÉLIVRANCE  
 page 2/2

BR2

REMETTEUR DES PIÈCES		Réervé à l'INPI
DATE	31 OCT. 2002	
LIEU	99	
N° D'ENREGISTREMENT	0213963	
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		

DB 540 W / 210502

<b>6 MANDATAIRE (si il y a lieu)</b>	
Nom GUERRE Prénom Dominique Cabinet ou Société Cabinet GERMAIN & MAUREAU	
N ° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel CPI 921104	
Adresse	Rue 12 Rue Boileau
	Code postal et ville 16 9466 LYON CEDEX 06
	Pays FRANCE
N° de téléphone (facultatif)	
N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)	
<b>7 INVENTEUR (S)</b>	
Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques	
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>	
Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
<input checked="" type="checkbox"/> Établissement immédiat ou établissement différé	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements) <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b> Uniquement pour les personnes physiques	
<input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG	
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b>	
<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences	
Le support électronique de données est joint <input type="checkbox"/> La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe <input type="checkbox"/>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes	
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)	
Dominique GUERRE CPI 921104	
<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>	
INPI - PARIS - 2002	



INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**BREVET D'INVENTION  
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11354\*03

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

Page suite N° 1.../1...



Réservé à l'INPI	
REMISE DES PIÈCES	
DATE	
LEU 95	31 OCT. 2002
N° D'ENREGISTREMENT	0213963
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 829 G W / 010702

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		IT/F25B3187FR
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> N°
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input type="checkbox"/> Personne morale <input checked="" type="checkbox"/> Personne physique
Nom ou dénomination sociale		SANCHEZ
Prénoms		Thierry
Forme juridique		
N° SIREN		<input type="text"/>
Code APE-NAF		<input type="text"/>
Domicile ou siège	Rue	Chemin de Rollinière
	Code postal et ville	138290 SATOLAS
	Pays	FRANCE
Nationalité		FRANCAISE
N° de téléphone (facultatif)		
N° de télécopie (facultatif)		
Adresse électronique (facultatif)		
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique
Nom ou dénomination sociale		
Prénoms		
Forme juridique		
N° SIREN		<input type="text"/>
Code APE-NAF		<input type="text"/>
Domicile ou siège	Rue	
	Code postal et ville	<input type="text"/>
	Pays	
Nationalité		
N° de téléphone (facultatif)		
N° de télécopie (facultatif)		
Adresse électronique (facultatif)		
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>		Dominique GUERRE CPI 921104
		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>
		M. ROCHE

La présente invention a trait au domaine de la désinfection et de la décontamination de matériel et d'appareils présentant des surfaces susceptibles de servir de support au dépôt d'un biofilm.

5 Ce matériel et/ou ces appareils sont par exemple ceux utilisés dans le domaine médical, comme les appareils d'analyse et tout le matériel comme les dispositifs médicaux réutilisables non autoclavables, comme les générateurs de dialyse ainsi que les implants (implants oculaires, valves cardiaques) et prothèses. Le matériel utilisé en dentisterie, voire les  
10 muqueuses et les dents elles-mêmes naturelles ou prothétiques sont susceptibles également d'être le siège de dépôt de biofilm. Le matériel utilisé dans l'industrie alimentaire et ou pharmaceutique peut également être cité ainsi que les centrales de climatisation et de manière plus générale tout matériel en contact avec un milieu hydrique susceptible de contenir des bactéries en  
15 suspension.

Le problème majeur actuel est l'élimination du biofilm constitué par la biomasse fixée sur les surfaces du matériel, des appareils et ou des muqueuses et qui constitue une cause d'infections persistantes et ou de contamination. En effet toute bactérie en suspension dans un milieu hydrique a  
20 la propriété d'adhérer aux supports qu'elle rencontre pour former un biofilm. Ce biofilm est un agglomérat de bactéries sur une surface entourées d'une matrice d'exopolysaccharides, sa formation est un phénomène naturel. Une fois formé le biofilm est très difficile à éliminer.

Les procédés actuels de décontamination et/ou de désinfection  
25 proposés pour lutter contre le biofilm, bien qu'ayant une certaine efficacité notamment antibactérienne n'éliminent cependant pas le biofilm du support, ce qui favorise son redéveloppement, et dans le cas particulier de l'hémodialyse, laisse en surface des supports des pyrogènes.

Pour certains appareils ou matériaux le biofilm est en outre renforcé  
30 par des dépôts de tartre constitués de carbonate de calcium et ou de magnésium.

L'utilisation actuelle de solutions décalcifiantes en renforcement des solutions purement désinfectantes pour le traitement de certain matériel ne permet cependant pas l'élimination totale de ce biofilm sauf à utiliser des  
35 produits comme l'eau de Javel qui si elles sont efficaces sur le biofilm sont souvent destructrices pour le matériel et les appareils médicaux. Ces solutions

sont en outre inutilisables sur des surfaces en contact avec des tissus et ou directement sur les muqueuses.

On connaît de Jacqueline L.F., Pathologie Biologie, mai 1994, p. 425 l'utilisation séquentielle d'enzymes et de désinfectant phénolique pour la 5 destruction des biofilms. On connaît de Johansen C., Applied and Environmental Microbiology, septembre 1997, p. 3724 , l'utilisation de combinaisons enzymatiques comme les glucose oxydases et la lactoperoxydase. On connaît de WO01/53010 un procédé enzymatique d'élimination des biofilms comprenant l'utilisation d'une enzyme appartenant au 10 groupe des carbohydrases et des protéases et leur utilisation séquentielle et également en combinaison ou de façon indépendante d'agents appartenant au groupe des biocides, chélatants, et autres nettoyants.

On connaît également de EP1186574, un procédé d'élimination des biofilms des surfaces en contact avec de l'eau caractérisé en ce qu'il comporte un 15 nettoyage avec un principe actif enzymatique et un nettoyage avec un produit désinfectant destiné à tuer les bactéries libérées par l'action du mélange enzymatique, mais les résultats obtenus ne sont pas satisfaisants et aucun procédé, ni produit ne permet actuellement d'éliminer ces biofilms.

20 La présente invention permet de résoudre le problème par la mise en œuvre d'un procédé et une sélection de produits permettant d'obtenir une efficacité d'élimination jamais obtenue jusqu'à présent.

La présente invention concerne un procédé d'élimination du biofilm 25 caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes effectuées simultanément ou consécutivement :

a) on dispose d'une solution comprenant un mélange enzymatique contenant au moins une enzyme choisie dans le groupe des protéases et au moins une enzyme choisie dans le groupe des osidases,

30 b) on dispose d'une solution comprenant un détergent présentant des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques,

c) on applique par lavage ou par circulation lesdites solutions sur la surface à traiter.

35 Le procédé selon l'invention est caractérisé en ce qu'il comprend en outre les étapes suivantes effectuées simultanément ou consécutivement :

- d) on dispose d'une solution comprenant un acide susceptible de dissoudre des dépôts de sels minéraux,
- e) on applique par lavage ou par circulation ladite solution sur la surface à traiter.

5

L'invention concerne également :

- le procédé selon l'invention, caractérisé en ce que en ce que la protéase est choisie dans le groupe constitué par les exopeptidases ou les endopeptidases comme la trypsine ;
- 10 - le procédé selon l'invention, caractérisé en ce que en ce que l'osidase ou carbohydrate est choisie dans le groupe constitué par l'amylase, la glycosidase et la galactosidase ;
- le procédé selon l'invention, caractérisé en ce que le mélange enzymatique comprend en outre une enzyme choisie dans le groupe constitué
- 15 par les hydrolases scindant les liaisons esters ou estérases, notamment les carboxylester-hydrolases comme la lipase, les phospholipases, et/ou les phosphonodiestérases comme la ribonucléase ;
- le procédé selon l'invention, caractérisé en ce que le mélange enzymatique est la pancréatine ;
- 20 - le procédé selon l'invention, caractérisé en ce que le détergent présentant des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques est une solution contenant des agents tensioactifs ;
- le procédé selon l'invention, caractérisé en ce que le détergent présentant des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques est une
- 25 solution alcaline contenant des agents tensioactifs et un ammonium quaternaire ;
- le procédé selon l'invention, caractérisé en ce que le détergent présentant des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques est une solution neutre contenant des agents tensioactifs ;
- 30 - le procédé selon l'invention, caractérisé en ce que le détergent présentant des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques est une solution acide contenant des agents tensioactifs, dans cette variante le détergent étant une solution acide il possède à la fois les propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques et permet sans étape
- 35 supplémentaire de dissoudre les dépôts de sels minéraux ;

- le procédé selon l'invention, caractérisé en ce que le détergent contient en outre un désinfectant comme une solution d'hypochlorite de sodium, ou d'hypochlorite de potassium ;

5           Lorsque dans une variante le procédé comprend une étape de lavage par une solution acide pour éliminer les dépôts de sels minéraux, l'acide est choisi dans le groupe constitué par l'acide citrique, l'acide peracétique, l'acide glycolique ou oxyacétique.

10           L'invention concerne également un kit destiné à l'élimination du biofilm caractérisé en ce qu'il comprend au moins une solution d'un mélange enzymatique contenant au moins une enzyme choisie dans le groupe des protéases et au moins une enzyme choisie dans le groupe des osidases, et au moins une solution d'un détergent présentant des propriétés antibactériennes, 15 antivirales et antifongiques,

          L'invention concerne également :

          - un kit selon l'invention, caractérisé en ce que la protéase est choisie dans le groupe constitué par les exopeptidases ou les endopeptidases comme la trypsine ;

20           - un kit selon l'invention, caractérisé en ce que l'osidase ou carbohydrase est choisie dans le groupe constitué par l'amylase, la glycosidase et la galactosidase

          - un kit selon l'invention, caractérisé en ce que le mélange enzymatique comprend en outre une enzyme choisie dans le groupe constitué

25           par les hydrolases scindant les liaisons esters ou estérases, notamment les carboxylester-hydrolases comme la lipase, les phospholipases, et/ou les phosphonodiesterases comme la ribonucléase ;

          - un kit selon l'invention, caractérisé en ce que le mélange enzymatique est la pancréatine ;

30           - un kit selon l'invention, caractérisé en ce que le détergent présentant des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques est une solution contenant des agents tensioactifs ;

          - un kit selon l'invention caractérisé en ce que le détergent présentant des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques est une 35 solution alcaline contenant des agents tensioactifs et un ammonium ;

- un kit selon l'invention caractérisé en ce que le détergent présentant des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques est une solution neutre contenant des agents tensioactifs ;
- 5 - un kit selon l'invention caractérisé en ce que le détergent présentant des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques est une solution acide contenant des agents tensioactifs ;
- un kit selon l'invention, caractérisé en ce qu'il comporte en outre une solution d'un désinfectant comme une solution d'hypochlorite de sodium, ou d'hypochlorite de potassium ;
- 10 - un kit selon l'invention, caractérisé en ce qu'il comporte en outre une solution d'un acide susceptible de dissoudre des dépôts de sels minéraux comme le carbonate de calcium ;
- un kit selon l'invention, caractérisé en ce que dans la solution acide pour éliminer les dépôts de sels minéraux, l'acide est choisi dans le
- 15 groupe constitué par l'acide citrique, l'acide peracétique, l'acide glycolique ou oxyacétique.

Dans une variante de l'invention la solution comprenant le mélange enzymatique et la solution comprenant le détergent forme une solution unique, l'invention concerne donc une composition destinée à l'élimination du biofilm caractérisée en ce qu'elle comprend un mélange enzymatique contenant au moins une enzyme choisie dans le groupe des protéases et au moins une enzyme choisie dans le groupe des osidases, et un détergent présentant des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques.

Dans un mode de réalisation particulier l'invention concerne une composition caractérisée en ce que le mélange enzymatique est la pancréatine.

On entend par biofilm, un ensemble de microorganismes développés sur un support, notamment bactéries, virus, parasites et champignons. Ce biofilm se développe et les microorganismes sécrètent une gangue d'exopolymères contenant entre autre des exopolysaccharides qui va former un film biologique appelé « slime » ou « glycocalix » et qui se présente sous forme d'un dépôt gélatineux à la surface des parois.

On entend par pancréatine, un extrait de pancréas, contenant les enzymes digestives de cette glande, notamment des enzymes protéolytiques

ou protéases et des enzymes comme la lipase, l'amylase, la ribonucléase et la trypsine.

On entend par détergent tout produit dont la composition a été spécialement étudiée pour concourir au développement des phénomènes de détergence et qui comprend des composants essentiels les agents de surface qui sont des tensio-actifs et éventuellement des composants complémentaires (adjuvants, renforçateurs, charges, additifs divers). Les tensio-actifs sont des composés chimiques qui introduits dans un liquide, en abaissent la tension superficielle, ce qui a pour effet d'en augmenter les propriétés mouillantes.

10

L'efficacité du procédé selon l'invention a été testée selon le plan d'expérience décrit ci-après.

Le procédé a été testé et mis en œuvre expérimentalement sur 5 types de biofilms ; les biofilms 1, 2, 3 et 5 ont été obtenus grâce à un modèle *in vitro* mimant le générateur d'hémodialyse.

20 Biofilm1 : enrichi en nutriments de croissance accélérée (3 jours) d'épaisseur moyenne (environ  $10^5$  UFC/cm<sup>2</sup>), très riche en « slime »

Biofilm 2 : non enrichi en nutriments, s'étant développé en 1 mois, équivalent à ceux rencontrés réellement dans les générateurs de dialyse (environ  $10^3$  UFC/cm<sup>2</sup>), très riche en cristaux de tartre

25 Biofilm 3 : enrichi en nutriments de croissance accélérée (5 jours) épais (environ  $10^9$  UFC/cm<sup>2</sup>), très riche en « slime »

30 Biofilm 4 : échantillon de tubulure véhiculant de l'eau pour hémodialyse, prélevé dans un centre, recouvert d'un biofilm d'environ  $10^3$  UFC/cm<sup>2</sup> mais s'étant développé en plus d'un an.

Biofilm 5 : enrichi en nutriments de croissance accélérée, s'étant développé dans un modèle « préventif » en 3 semaines.

Réalisation du modèle in vitro

Un corps de réacteur de 250 ml a été rempli par un dialysat non stérile, préparé par dilution de solutions concentrées pour hémodialyse stériles apyrogènes (Clearflex®, Bieffe Medital), avec de l'eau osmosée non stérile contenant *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Flavimonas orizibitans*, produite en continu au laboratoire.

Le milieu contaminant circulait en circuit fermé dans une boucle de tubulure en silicone de 1,5 mètres de long et de 5 mm de diamètre interne à un débit de 500 ml/min grâce à une pompe péristaltique. L'ensemble des tubulures et le corps de réacteur ont été préalablement stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 30 minutes. Ainsi, le dialysat contaminé naturellement par les bactéries de l'eau était la seule source de micro-organismes.

L'ensemble du système a été maintenu à une température de 37°C grâce à une plaque chauffante sur laquelle était posé le corps de réacteur.

Dans le cas des biofilm 1, 3 et 5 la croissance bactérienne et par conséquent le développement du biofilm ont été accélérés par ajout de bouillon de culture LB dilué au 1/50<sup>ème</sup>, soit une solution de bouillon LB diluée au 1/5<sup>ème</sup> apportée à un débit égal au 1/10<sup>ème</sup> de celui du dialysat. Les débits d'apport du dialysat et du bouillon de culture, régulés par une pompe péristaltique, étaient respectivement de 5 et 0,5 ml/minute.

Dans le cas du biofilm 5, le modèle a été modifié de la façon suivante :

Des segments de tubulures en silicone connectés entre-eux par des raccords en polypropylène, ont été parcourus pendant 4 heures par un dialysat non stérile enrichi en milieu de culture. Toutes les 4 heures, les tubulures ont été déconnectées et intégrées à des systèmes de désinfection (voir ci –après) Après traitement, les tubulures ont été reconnectées et le milieu contaminant a été remis à circuler pendant 4 heures. En parallèle, des tubulures témoins ont été réparties dans le circuit et sans jamais subir de désinfection. Chaque jour, 2 séances d'hémodialyse entrecoupées chacune d'une séance de désinfection ont ainsi pu être effectuées. La nuit et les week-end, le système était arrêté après la dernière désinfection et les tubulures étaient maintenues vides à température ambiante. Le système a fonctionné jusqu'au développement d'un biofilm mature sur les tubulures témoins.

### Produits et combinaisons testés

5 17 produits ont été testés appartenant à 6 familles différentes. La liste de ces produits est donnée dans le tableau I. Ces produits ont été évalués seuls ou en combinaisons. Ainsi, un screening complet de 60 combinaisons a été réalisé sur le biofilm 1 ; 9 combinaisons ont ensuite été évaluées sur le biofilm 2 ; enfin, la meilleure combinaison sélectionnée a été testée sur les 10 biofilms 3, 4 et 5.

Tableau I : **Liste des produits testés**

Famille	Produit	Fournisseur
Surfactants /détergents	Sodium dodecyl sulfate Triton RBS Tween	Sigma Sigma Chemical Products Sigma
Enzymes	Trypsine Pancréatine Protéase fongique Thermolysine	Sigma Sigma Sigma Sigma
Acides	Acide perchlorique Acide citrique Acide trichloracétique	Merck Merck Merck
Produits de dissociation cellulaire	Versène Cell dissociation	Sigma Sigma
Alcalins	NaOH KOH	Prolabo Prolabo
Divers	Eau de Javel Tampon pH10 (Bicarbonate)	Préparé au labo

15 Echantillonnage

Les tubulures recouvertes des biofilms 1, 2, et 3 ont été découpées en segments de 5 cm de long. Pour le screening sur les biofilms 1 et 2, chaque segment a été sélectionné par tirage au sort pour subir l'un des 20 différents traitements à étudier. Des échantillons contrôle prélevés au hasard sur la boucle en silicium ont été conservés non traités

### Traitement des échantillons

Les segments de tubulure à traiter ont été fixés sur la tubulure descendante d'un montage constitué de 2 tubulures, l'une ascendante, l'autre descendante, d'une pompe péristaltique et d'un bain marie (pour les traitements effectués à une température supérieure à 20°C). Le produit à tester en mode « recirculation » a été mis en solution dans une fiole de 100 ml et a été entraînée par la pompe péristaltique à un débit de 500 ml/min en circuit fermé à travers les tubulures pendant une durée respectant les temps de contact décrits dans le tableau II. Le produit à tester en mode « statique » a été mis en solution dans une fiole de 100 ml et a été entraînée par la pompe péristaltique jusqu'à remplissage des tubulures ; puis, la pompe a été arrêtée et le produit maintenu en stase pendant le temps de contact souhaité. Après chaque traitement par un produit donné, les échantillons de tubulures ont été rincés 5 minutes par de l'eau osmosée.

### Méthodes d'étude de l'efficacité des traitements

Trois paramètres fondamentaux ont été retenus pour l'évaluation de l'efficacité des traitements

- la réduction de la surface couverte
- la réduction du nombre de bactéries cultivables
- la réduction du taux d'endotoxines

Les screening sur les biofilms 1 et 2 n'ont tenu compte que du premier paramètre. La meilleure combinaison retenue a ensuite été évaluée de manière approfondie pour son efficacité sur la mortalité bactérienne et l'élimination des endotoxines.

#### Méthode d'évaluation quantitative de la surface couverte :

Les biofilms témoins et traités ont été colorés :

- soit par une solution de cristal violet à 0,25%
- soit par une solution de fluorochromes Baclight® (Syto 9 et iodure de propidium). Les bactéries viables apparaissent vertes ; les mortes apparaissent jaunes ou rouges.

Les échantillons de tubulure en silicium recouvertes de biofilms coloré ont été attachés sur des lames de verre et observés au microscope optique, relié lui-même à une caméra et à une logiciel d'analyse d'images « Scion Images ». Ainsi, plusieurs photographies d'un même échantillon (6 à 5 10) ont été prises, la surface colorée a été évaluée quantitativement par le logiciel d'analyse d'images, et une valeur moyenne de surface couverte par échantillon a été calculée. Cette valeur moyenne a été comparée à la surface couverte des échantillons témoins non traités : un pourcentage de réduction de la surface couverte a alors été calculé.

10 D'autre part, pour une observation plus précise, les échantillons traités par la combinaison la plus efficace ont été observés au microscopie confocal laser.

#### Méthode de quantification des bactéries cultivables

15 Le biofilm recouvrant les échantillons de tubulure a été détaché du support par un grattoir mécanique assurant un décrochage complet, homogène et reproductible. Ce grattoir était constitué d'un tournevis électrique à l'extrémité duquel était fixée une spatule en acier inoxydable stérilisable à la flamme. La rotation de la spatule dans la lumière de la tubulure a entraîné la biomasse au fond d'un tube stérile. L'entraînement a été facilité par un filet d'eau stérile. Les éventuels agrégats bactériens ont ensuite été dissociés au travers de l'aiguille d'une seringue. Le nombre de bactéries cultivables a été déterminé par dénombrement des UFC après étalement de la suspension bactérienne résultante sur gélose R<sub>2</sub>A incubée à température ambiante pendant 7 jours.

20 Pour plus de précision, les échantillons se révélant non contaminés après étalement ont été totalement filtrés et la membrane de filtration a été incubée sur gélose R<sub>2</sub>A à température ambiante pendant 7 jours.

25 30 Méthode de dosage des endotoxines

Les endotoxines bactériennes ont été quantifiées dans la suspension bactérienne résultant du décrochage (voir ci-dessus) par les test 35 standardisé de référence : le test LAL chromogénique cinétique (Charles River Endosafe).

## Résultats de l'étude sur les biofilms 1 et 2

5 Les résultats des screening sur les biofilms 1 et 2 sont présentés dans les tableaux II et III

10

Tableau II : Screening sur le Biofilm 1

Trait <sup>t</sup> n°	produit	conc	°C	temps	mode	résultat
1	SDS	5%	amb	40 min	stat	**
2	triton	5%	amb	40 min	stat	*
3	RBS	5%	amb	40 min	stat	**
4	tween	5%	amb	40 min	stat	.
5	versene	pure	amb	40 min	stat	.
6	trypsin	EDTA IX	amb	40 min	stat	.
7	trypsin	0,25%	37	40 min	stat	**
8	SDS	5%	amb	40 min	recirc	*/.
9	tween	5%	amb	40 min	recirc	.
10	RBS	5%	amb	40 min	recirc	***
11	perchlo ac	0,05%	amb	40 min	stat	.
12	NaOH	0.01N	amb	40 min	stat	*
13	KOH	0.02N	amb	40 min	stat	**
14	TCA	0.25%	amb	40 min	stat	.
15	KOH	0.02N	amb	40 min	recirc	**
16	triton	5%	amb	40 min	recirc	.
17	RBS	5%	amb	1h	recirc	***
18	RBS	5%	amb	24h	recirc	****
19	RBS	2%	amb	1h	recirc	***
20	RBS	2%	amb	24h	recirc	****
21	KOH	0.02N	amb	1h	recirc	***
22	KOH	0.02N	amb	24h	recirc	****
23	pancreatin	1%	37	1h	recirc	****
24	pancreatin	1%	37	1h	stat	**
25	pancreatin	0,10%	37	2h	recirc	.
26	citric ac	3%	amb	40 min	recirc	.
27	KOH	0.002N	amb	40 min	recirc	**
28	Cell dissoc	pure	37	40 min	stat	**
29	trypsin	0,25%	37	40 min	recirc	.
30	protease	0,25%	37	40 min	recirc	**
31	RBS	2%	amb	40 min	recirc	****
32	RBS +Cl	2%+0.2%	amb	40 min	recirc	****
33	thermolys	2mg/50ml	37	40 min	recirc	**

34	pancreatin	0,50%	37	40 min	recirc	***
35	KOH	0.001N	amb	40 min	recirc	**
36	RBS	2%ph7	amb	40 min	recirc	***
37	trypsin	1%	37	40 min	recirc	*
38	protease	1%	37	40 min	recirc	**
39	RBS	1% ph10	amb	40 min	recirc	****
40	RBS	0.5%ph10	amb	40 min	recirc	***(*)
41	RBS	1% ph10	amb	5 min	recirc	***
42	RBS	0.1%ph10	amb	40 min	recirc	**(*)
43	RBS + pancreatin	1% ph10 1%	40	5 min	recirc	*
44	RBS + pancreatin	1% ph10 0,50%	40	5 min	recirc	**
45	RBS + pancreatin	1% ph10 0,50%	40	40	recirc	***
46	buffer ph10	pure	37	40	recirc	*
47	pancreatin	0.5 ph10	37	40	recirc	**
48	pancreatin et RBS	0.5%ph7 1% ph10	37 amb	5 min 5 min	recirc recirc	*****
49	pancreatin	0.25%ph7	37	5min	recirc	***
50	pancreatin + thermolys	0.25%ph7 2mg/50ml	37	5min	recirc	**
51	pancreatin + thermolys + protease	0.25%ph7 2mg/50ml 0,25%	37	5min	recirc	**
52	pancreatin + thermolys + protease + trypsin	0.25%ph7 2mg/50ml 0,25% 0,25%	37	5min	recirc	**
53	pancreatin et RBS	0,25 1%	37 amb	5 min 5 min	recirc	*****
54	pancreatin et RBS	0,25% 0,50%	37 amb	5 min 5 min	recirc	*****
55	pancreatin et RBS	0,25% 0,50%	37 amb	5 min 30 min	recirc	*****
56	pancreatin et RBS	0,10% 0,50%	37 amb	5 min 5 min	recirc	*****
57	pancreatin et RBS	0,10% 0,10%	37 amb	5 min 5 min	recirc	*****
58	citric ac et RBS	3% 1%	37 amb	5 min 30 min	recirc	*****
59	citric ac et pancreatin et RBS	3% 0,50% 1%	37 37 amb	5 min 5 min 30 min	recirc	*****
60	pancreatin et RBS	0,50% 1%	37 amb	5 min 30 min	recirc	*****

Légende	Elimination	% réduction surface couverte
*	Pas d'élimination Mauvaise élimination	0 0- 25 %
**	Elimination modérée	25- 50 %
***	Bonne élimination	50- 75 %
****	Excellente élimination	75- 99 %
*****	Elimination complète	10 0%

+ = mélange  
et = application séquentielle

5

Tableau III : Screening sur le biofilm 2

Trait <sup>t</sup> n°	produit	conc	°C	temps	mode	résultat
1	Pancreatin et RBS	0.5%ph 7 1%ph10	37 amb	5 min 5 min	recirc recirc	***
2	citric ac et RBS	3% 1%	37 amb	5 min 30 min	recirc	*****
3	pancreatin et citric ac et RBS	0,50% 3% 1%	37 37 amb	5 min 5 min 30 min	recirc	*****
4	pancreatin et RBS	0,50% 1%	37 amb	5 min 30 min	recirc	***
5	citric ac et pancreatin et RBS	3% 0,50% 1%	37 37 amb	5 min 5 min 30 min	recirc	*****
6	pancreatin et RBS	0,50% 1%	37 amb	5 min 30 min	recirc	***
7	citric ac	3%	37	5 min	recirc	****
8	citric ac et RBS	3% 0,50%	37 amb	5 min 30 min	recirc	*****
9	citric ac et RBS	3% 0,10%	37 amb	5 min 30 min	recirc	****

La combinaison retenue suite à ces screening a été celle permettant la meilleure élimination des 2 biofilms, à savoir, la « combinaison K » suivante :

5                    Produit A = Pancreatin®, réactif de laboratoire commercialisé par Sygma. Extrait du pancréas de porc, il s'agit d'un mélange enzymatique contenant entre autre lipase, protéase, amylase, trypsine, ribonuclease...

10                  Produit B = acide citrique

Dans le cas particulier de la désinfection des générateurs de dialyse, ce produit agit comme décalcifiant et élimine les cristaux de tartre qui emprisonnent les bactéries et favorisent l'adhésion du biofilm au support.

15                  Produit C = RBS®, solution détergente alcaline moussante, commercialisée par la société Chemical Products, à propriétés bactéricides, virucides et fongicides, contenant des agents tensio-actifs et un ammonium quaternaire (agent désinfectant).

20                  Données qualitatives et quantitatives

Des photographies des biofilms 1 et 2 avant et après action de la combinaison K ont permis de quantifier visuellement l'action de la combinaison.

25                  Le tableau IV donne les valeurs des paramètres mesurés avant et après action de la combinaison K.

**Tableaux IV :** Données quantitatives de l'évaluation de l'efficacité de la combinaison K sur les biofilms 1 et 2

30                  **Tableau IV a) Biofilm 1**

Paramètre	Avant traitement	Après traitement	% réduction
Surface couverte (Inches <sup>2</sup> )	20	<0,001	>99,99
Bactéries cultivables (UFC/cm <sup>2</sup> )	10 <sup>5</sup>	<1	>99,999
Endotoxines(EU/cm <sup>2</sup> )	10039	<0,005	>99,99

Tableau IV b) Biofilm 2

Paramètre	Avant traitement	Après traitement	% réduction
Surface couverte (Inches <sup>2</sup> )	13,4	<0,001	>99,99
Bactéries cultivables (UFC/cm <sup>2</sup> )	3.10 <sup>3</sup>	<1	>99,999
Endotoxines(EU/cm <sup>2</sup> )	40	<0,005	>99,99

## 5 Détermination de la MIC du RBS

Le pouvoir antibactérien de cette combinaison étant porté par le RBS, sa concentration minimale inhibitrice a été déterminée *sur les germes constituant les biofilms étudiés*.

10 Un mélange de dialysat frais contaminé (préparé avec de l'eau osmosée non stérile contenant les germes décrits précédemment) et de bouillon LB dans les proportions 50/50 v/v a été réalisé. Des solutions de RBS aux concentrations de 100 %, 50 %, 10 %, 5 %, 1 %, 0,5 % et 0,1 % ont été faites par dilutions en cascades, puis 300 µl de chacune de ces solutions ont 15 été ajoutés à 3 ml du mélange contaminé. Après 12 heures d'incubation à température ambiante, les UFC ont été dénombrées sur gélose R<sub>2</sub>A pour chacune des concentrations de RBS testées.

20 La MIC est définie comme étant la plus faible concentration qui conduit à l'inhibition de la croissance des germes. Les résultats sont donnés dans le tableau V.

Tableau V : Détermination de la MIC du RBS

Conc (%)	0	0,01	0,05	0,5	1	2	3	4	5	10
UFC/ml	2 10 <sup>8</sup>	4,8 10 <sup>7</sup>	2,1 10 <sup>7</sup>	9 10 <sup>6</sup>	6,1 10 <sup>6</sup>	1,4 10 <sup>5</sup>	1200	200	0	0

25

Par sécurité, on choisit d'utiliser la solution de RBS diluée de manière à obtenir 1,5 MIC.

Protocole initial retenu

5 Pancréatine 0,5 %, pH 7,3 : Préparation pour 100 ml : 500 mg de poudre de Pancréatine + 1 g de tampon PBS (phosphate buffer saline) (Sigma) pulvérisé, dilués dans 100 ml d'eau pour hémodialyse (EHD).

Passage de la solution en circuit fermé dans les tubulures à un débit de 500 ml/min pendant 5 minutes à 37°C.

Rinçage 5 minutes par de l'EHD à 500ml/min en circuit ouvert.

10 Acide citrique 3%, pH 2,2 : Préparation pour 100 ml : 3 g d'acide citrique pulvérisé (Merck) dans 100 ml d'EHD.

Passage de la solution en circuit fermé dans les tubulures à un débit de 500 ml/min pendant 5 minutes à 20°C

Rinçage 5 minutes par de l'EHD à 500ml/min en circuit ouvert.

15 RBS<sup>®</sup> 7% pH 10 : préparation pour 100 ml : 7 ml de solution concentrée + 566 mg de carbonate de sodium pulvérisés + 388 mg de bicarbonate de sodium pulvérisé, dilués dans QSP 100 ml d'EHD.

20 Passage de la solution en circuit fermé dans les tubulures à un débit de 500 ml/min pendant 30 minutes à 20°C

Rinçage 5 minutes par de l'EHD à 500ml/min en circuit ouvert.

25 Résultats de l'étude sur les biofilms 3 et 4

La combinaison K sous sa forme initiale décrite ci-dessus a laissé quelques cellules adhérentes sur les biofilms 3 et 4, particulièrement épais ou anciens. Pour l'élimination de tels biofilms, une « formule enrichie » de la 30 combinaison K a été développée.

Formule « enrichie » :

35 Pancréatine 1 %, pH 7,3 : Préparation pour 100 ml : 1 g de poudre de Pancréatine + 1g de tampon PBS (phosphate buffer saline) (Sigma) pulvérisé, dilués dans 100 ml d'eau pour hémodialyse (EHD).

Passage de la solution en circuit fermé dans les tubulures à un débit de 500 ml/min pendant 5 minutes à 37°C.

Rinçage 5 minutes par de l'EHD à 500ml/min en circuit ouvert.

5        Acide citrique 5%, pH 2,2 : Préparation pour 100 ml : 5 g d'acide citrique pulvérisé (Merck) dans 100 ml d'EHD.

Passage de la solution en circuit fermé dans les tubulures à un débit de 500 ml/min pendant 30 minutes à 20°C

Rinçage 5 minutes par de l'EHD à 500ml/min en circuit ouvert.

10

RBS® 15% pH 10 : préparation pour 100 ml : 15 ml de solution concentrée + 566 mg de carbonate de sodium pulvérisés + 388 mg de bicarbonate de sodium pulvérisé + 6 ml d'eau de Javel concentrée à 5,2 % (concentration finale en hypochlorite de sodium de 0,3 %), dilués dans QSP

15        100 ml d'EHD

Passage de la solution en circuit fermé dans les tubulures à un débit de 500 ml/min pendant 1 nuit à 20°C

Rinçage 5 minutes par de l'EHD à 500ml/min en circuit ouvert.

20

#### Données qualitatives et quantitatives

Des photographies du biofilm 4 avant et après action de la combinaison K enrichie ont permis de quantifier visuellement l'efficacité du procédé selon l'invention..

25

Le tableau VI donne les valeurs des paramètres mesurés avant et après action de la combinaison K enrichie sur le biofilm 4

**Tableaux VI :** Données quantitatives de l'évaluation de l'efficacité de la combinaison K enrichie sur le biofilm 4

30

Paramètre	Avant traitement	Après traitement	% réduction
Surface couverte (Inches <sup>2</sup> )	25	<0,001	>99,99
Bactéries cultivables (UFC/cm <sup>2</sup> )	1600	<1	>99,999
Endotoxines(EU/cm <sup>2</sup> )	115	<0,005	>99,999

## Résultats de l'étude sur le biofilm 5

5 Un biofilm très épais (plus de  $3.10^9$  UFC/cm<sup>2</sup>) très riche en slime, très riche en endotoxines bactériennes et couvrant totalement la surface de l'échantillon (30 Inches<sup>2</sup>) s'est développé à la surface des échantillons contrôles non traités, alors que seulement quelques cellules adhérentes mortes se sont déposées en surface des échantillons traités toutes les 4 heures par le  
10 combinaison K non enrichie (formule initiale).

Les données quantitatives sont présentées dans le tableau VII.

**Tableau VII : Efficacité de la combinaison K sur le biofilm 5**

15

Paramètre	Sans traitement	Avec traitement	% inhibition
Surface couverte (Inches <sup>2</sup> )	30	1,3	96
Bactéries cultivables (UFC/cm <sup>2</sup> )	$3,9 10^9$	<1	>99,999
Endotoxines(EU/cm <sup>2</sup> )	65282	0,4	>99,999

Des photographies du biofilm contrôle et des échantillons traités ont permis de vérifier l'efficacité du procédé selon l'invention.

20

Le procédé et le kit selon l'invention peuvent être utilisés dans les circuits des appareils d'hémodialyse, dans la lutte contre la légionellose par exemple dans les circuits d'eau chaude et les systèmes de climatisation et les tours de refroidissement, dans l'industrie agroalimentaire, dans les salles à atmosphère contrôlée ou dans les salles à atmosphères confinées, pour le nettoyage du matériel en dentisterie pour les dispositifs médicaux réutilisables et non autoclavables.

30

Dans les appareils de circulation de fluides, le procédé selon l'invention sera mis en œuvre, par introduction de la ou des solutions



simultanément ou séquentiellement dans les circuits dans lesquels le biofilm doit être éliminé, mise en circulation pendant une période suffisante pour permettre l'élimination du biofilm, puis purge et rinçage si nécessaire.

5 Pour le traitement de surfaces, plans de travail, prothèses, le procédé selon l'invention sera mis en œuvre par application ou par trempage de la ou des solutions selon l'invention de façon séquentielle ou simultanée puis rinçage si nécessaire.

## REVENDICATIONS

1. Procédé d'élimination du biofilm caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes effectuées simultanément ou consécutivement :
  - a) on dispose d'une solution comprenant un mélange enzymatique contenant au moins une enzyme choisie dans le groupe des protéases et au moins une enzyme choisie dans le groupe des osidases ou carbohydrases,
  - b) on dispose d'une solution comprenant un détergent présentant des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques,
  - c) on applique par lavage ou par circulation lesdites solutions sur la surface à traiter.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend en outre les étapes suivantes effectuées simultanément ou consécutivement :
  - d) on dispose d'une solution comprenant un acide susceptible de dissoudre des dépôts de sels minéraux,
  - e) on applique par lavage ou par circulation ladite solution sur la surface à traiter.
3. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que en ce que la protéase est choisie dans le groupe constitué par les exopeptidases ou les endopeptidases comme la trypsine.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que en ce que l'osidase ou carbohydraise est choisie dans le groupe constitué par l'amylase, la glycosidase et la galactosidase
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le mélange enzymatique comprend en outre une enzyme choisie dans le groupe constitué par la lipase, l'amylase et la ribonucléase.
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le mélange enzymatique est la pancréatine.

## REVENDICATIONS

1. Procédé d'élimination du biofilm caractérisé en ce qu'il  
5 comprend au moins les étapes suivantes effectuées simultanément ou  
consécutivement :

- a) on dispose d'une solution comprenant un mélange enzymatique  
contenant au moins une enzyme choisie dans le groupe des protéases et au  
moins une enzyme choisie dans le groupe des osidases ou carbohydrases,
- 10 b) on dispose d'une solution comprenant un détergent présentant  
des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques,
- c) on applique par lavage ou par circulation lesdites solutions sur la  
surface à traiter.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il  
15 comprend en outre les étapes suivantes effectuées simultanément ou  
consécutivement :

- d) on dispose d'une solution comprenant un acide susceptible de  
dissoudre des dépôts de sels minéraux,
- e) on applique par lavage ou par circulation ladite solution sur la  
20 surface à traiter.

3. Procédé selon l'une quelconque des revendications  
précédentes, caractérisé en ce que en ce que la protéase est choisie dans le  
groupe constitué par les exopeptidases ou les endopeptidases comme la  
trypsine .

25 4. Procédé selon l'une quelconque des revendications  
précédentes, caractérisé en ce que en ce que l'osidase ou carbohydrase est  
choisie dans le groupe constitué par l'amylase, la glycosidase et la  
galactosidase

30 5. Procédé selon l'une quelconque des revendications  
précédentes, caractérisé en ce que le mélange enzymatique comprend en  
outre une enzyme choisie dans le groupe constitué par la lipase, l'amylase et la  
ribonucléase.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications  
précédentes, caractérisé en ce que le mélange enzymatique est la pancréatine.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le détergent présentant des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques est une solution contenant des agents tensioactifs .

5 8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le détergent présentant des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques est une solution alcaline contenant des agents tensioactifs et un ammonium.

10 9. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le détergent présentant des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques est une solution neutre contenant des agents tensioactifs.;

15 10. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le détergent présentant des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques est une solution acide contenant des agents tensioactifs .

20 11. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la solution détergente contient en outre un désinfectant comme une solution d'hypochlorite de sodium, ou d'hypochlorite de potassium.

12. Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce que dans la solution acide pour éliminer les dépôts de sels minéraux, l'acide est choisi dans le groupe constitué par l'acide citrique, l'acide peracétique, l'acide glycolique ou oxyacétique.

25 13. Kit destiné à l'élimination du biofilm caractérisé en ce qu'il comprend au moins une solution d'un mélange enzymatique contenant au moins une enzyme choisie dans le groupe des protéases et au moins une enzyme choisie dans le groupe des osidases ou carbohydrases, et au moins une solution d'un détergent présentant des propriétés antibactériennes, 30 antivirales et antifongiques.

14. Kit selon la revendication 13, caractérisé en ce que la protéase est choisie dans le groupe constitué par les exopeptidases ou les endopeptidases comme la trypsine.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le détergent présentant des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques est une solution contenant des agents tensioactifs .

5 8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le détergent présentant des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques est une solution alcaline contenant des agents tensioactifs et un ammonium.

10 9. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le détergent présentant des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques est une solution neutre contenant des agents tensioactifs.

15 10. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le détergent présentant des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques est une solution acide contenant des agents tensioactifs .

20 11. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la solution détergente contient en outre un désinfectant comme une solution d'hypochlorite de sodium, ou d'hypochlorite de potassium.

12. Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce que dans la solution acide pour éliminer les dépôts de sels minéraux, l'acide est choisi dans le groupe constitué par l'acide citrique, l'acide peracétique, l'acide glycolique ou oxyacétique.

25 13. Kit destiné à l'élimination du biofilm caractérisé en ce qu'il comprend au moins une solution d'un mélange enzymatique contenant au moins une enzyme choisie dans le groupe des protéases et au moins une enzyme choisie dans le groupe des osidases ou carbohydrases, et au moins une solution d'un détergent présentant des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques.

30 14. Kit selon la revendication 13, caractérisé en ce que la protéase est choisie dans le groupe constitué par les exopeptidases ou les endopeptidases comme la trypsine.

15. Kit selon l'une quelconque des revendications 13 ou 14 caractérisé en ce que l'osidase ou carbohydrate est choisie dans le groupe constitué par l'amylase, la glycosidase et la galactosidase.

5 16. Kit selon l'un quelconque des revendications 13 à 15, caractérisé en ce que le mélange enzymatique comprend en outre une enzyme choisie dans le groupe constitué par les hydrolases scindant les liaisons esters ou estérases, notamment les carboxylester-hydrolases comme la lipase, les phospholipases, et/ou les phosphonodiestérases comme la ribonucléase ;

10 17. Kit selon l'une quelconque des revendications 13 à 16 caractérisé en ce que le mélange enzymatique est la pancréatine.

18. Kit selon l'une quelconque des revendications 13 à 17

15 caractérisé en ce que le détergent présentant des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques est une solution contenant des agents tensioactifs.

19. Kit selon l'un quelconque des revendications 13 à 17, caractérisé en ce que le détergent présentant des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques est une solution alcaline contenant des agents tensioactifs et un ammonium.

20. Kit selon l'une quelconque des revendications 13 à 17, caractérisé en ce que le détergent présentant des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques est une solution neutre contenant des agents tensioactifs .

21. Kit selon l'une quelconque des revendications 13 à 17, caractérisé en ce que le détergent présentant des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques est une solution acide contenant des agents tensioactifs .

22. Kit selon l'une quelconque des revendications 13 à 21

30 caractérisé en ce qu'il comporte en outre une solution d'un désinfectant comme une solution d'hypochlorite de sodium, ou d'hypochlorite de potassium.

23. Kit selon l'une quelconque des revendications 13 à 22

35 caractérisé en ce qu'il comporte en outre une solution d'un acide susceptible de dissoudre des dépôts de sels minéraux comme le carbonate de calcium.

5. Kit selon l'une quelconque des revendications 13 ou 14 caractérisé en ce que l'osidase ou carbohydrase est choisie dans le groupe constitué par l'amylase, la glycosidase et la galactosidase.

16. Kit selon l'un quelconque des revendications 13 à 15, 5 caractérisé en ce que le mélange enzymatique comprend en outre une enzyme choisie dans le groupe constitué par les hydrolases scindant les liaisons esters ou estérases, notamment les carboxylester-hydrolases comme la lipase, les phospholipases, et/ou les phosphonodiestérases comme la ribonucléase.

17. Kit selon l'une quelconque des revendications 13 à 16 10 caractérisé en ce que le mélange enzymatique est la pancréatine.

18. Kit selon l'une quelconque des revendications 13 à 17 caractérisé en ce que le détergent présentant des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques est une solution contenant des agents tensioactifs.

19. Kit selon l'un quelconque des revendications 13 à 17, 15 caractérisé en ce que le détergent présentant des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques est une solution alcaline contenant des agents tensioactifs et un ammonium.

20. Kit selon l'une quelconque des revendications 13 à 17, caractérisé en ce que le détergent présentant des propriétés antibactériennes, 20 antivirales et antifongiques est une solution neutre contenant des agents tensioactifs .

21. Kit selon l'une quelconque des revendications 13 à 17, caractérisé en ce que le détergent présentant des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques est une solution acide contenant des agents 25 tensioactifs .

22. Kit selon l'une quelconque des revendications 13 à 21 caractérisé en ce qu'il comporte en outre une solution d'un désinfectant comme une solution d'hypochlorite de sodium, ou d'hypochlorite de potassium.

23. Kit selon l'une quelconque des revendications 13 à 22 30 caractérisé en ce qu'il comporte en outre une solution d'un acide susceptible de dissoudre des dépôts de sels minéraux comme le carbonate de calcium.

24. Kit selon la revendication 23 caractérisé en ce que l'acide est choisi dans le groupe constitué par l'acide citrique une l'acide peracétique, l'acide glycolique ou oxyacétique.

15. Kit selon l'une quelconque des revendications 13 ou 14 caractérisé en ce que l'osidase ou carbohydrate est choisie dans le groupe constitué par l'amylase, la glycosidase et la galactosidase.

16. Kit selon l'un quelconque des revendications 13 à 15, 5 caractérisé en ce que le mélange enzymatique comprend en outre une enzyme choisie dans le groupe constitué par les hydrolases scindant les liaisons esters ou estérases, notamment les carboxylester-hydrolases comme la lipase, les phospholipases, et/ou les phosphonodiestérases comme la ribonucléase.

17. Kit selon l'une quelconque des revendications 13 à 16 10 caractérisé en ce que le mélange enzymatique est la pancréatine.

18. Kit selon l'une quelconque des revendications 13 à 17 caractérisé en ce que le détergent présentant des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques est une solution contenant des agents tensioactifs.

19. Kit selon l'un quelconque des revendications 13 à 17, 15 caractérisé en ce que le détergent présentant des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques est une solution alcaline contenant des agents tensioactifs et un ammonium.

20. Kit selon l'une quelconque des revendications 13 à 17, caractérisé en ce que le détergent présentant des propriétés antibactériennes, 20 antivirales et antifongiques est une solution neutre contenant des agents tensioactifs.

21. Kit selon l'une quelconque des revendications 13 à 17, caractérisé en ce que le détergent présentant des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques est une solution acide contenant des agents 25 tensioactifs.

22. Kit selon l'une quelconque des revendications 13 à 21 caractérisé en ce qu'il comporte en outre une solution d'un désinfectant comme une solution d'hypochlorite de sodium, ou d'hypochlorite de potassium.

23. Kit selon l'une quelconque des revendications 13 à 22 30 caractérisé en ce qu'il comporte en outre une solution d'un acide susceptible de dissoudre des dépôts de sels minéraux comme le carbonate de calcium.

24. Kit selon la revendication 23 caractérisé en ce que l'acide est choisi dans le groupe constitué par l'acide citrique, l'acide peracétique, l'acide glycolique ou oxyacétique.

24. Kit selon la revendication 23 caractérisé en ce que l'acide est choisi dans le groupe constitué par l'acide citrique une l'acide peracétique, l'acide glycolique ou oxyacétique.

5 25. Composition destinée à l'élimination du biofilm caractérisée en ce qu'elle comprend un mélange enzymatique contenant au moins une enzyme choisie dans le groupe des protéases et au moins une enzyme choisie dans le groupe des osidases, et un détergent présentant des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques.

10

26. Composition selon la revendication 25, caractérisée en ce que le mélange enzymatique est la pancréatine.

## DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
 75800 Paris Cedex 08  
 Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

**BREVET D'INVENTION****CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1... / 1...

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W /260593

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		IT/F25B3187FR	
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		0613963	
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum) PROCEDE D'ELIMINATION DU BIOFILM			
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b> MARION Karine SANCHEZ Thierry			
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b> (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		MARION	
Prénoms		Karine	
Adresse	Rue	Chemin de Rollinière	
	Code postal et ville	38290	SATOLAS
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> <b>(Nom et qualité du signataire)</b> Dominique GUERRE CPI 921104 Lyon, le 31 octobre 2002			

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**